

水溶性ビタミン類によるアスコルビン酸接触酸化抑制作用 主にピリドキサミンおよび葉酸について

The Inhibitive Action of Some Water-soluble Vitamins against the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid. The Effect on the Pyridoxamine and Folic Acid.

川 村 真 美・平 見 嘉 彦

Mami KAWAMURA and Yoshihiko HIRAMI

(昭和63年11月17日 受理)

Summary

Some water-soluble vitamins except thiamine were examined to find the inhibition against the catalytic oxidation of L-ascorbic acid (AsA) and pyridoxamine and folic acid had a highly inhibitive action.

The studies on the two vitamins were carried out in some detail. According to the results, it was found that the inhibitive action of pyridoxamine could be expressed by a linear equation and that the inhibitive action of folic acid was a catalytic reaction with slow activation and it could be approximately expressed by an exponential equation. And also the relation between the concentration of pyridoxamine and the rate constant of the catalytic oxidation of L-ascorbic acid was investigated.

The inhibitive actions of pyridoxamine and of folic acid were examined in relation to the effect on pH.

I 緒 言

L-アスコルビン酸を安定化させる物質の発見, 研究は数多くある。ビタミン類ではビタミンB₁とL-アスコルビン酸(以下AsAと略す)との関係を, ビタミンB₁の消長から見ているものが多く, AsA安定化のためのビタミンについて記述したものは多くない。また, その他の水溶性ビタミンを用いたものは, 江口⁽¹⁾⁽²⁾の報告はあるが多くない。また, 筆者らはAsA接触酸化反応が窒素を含む塩基であるアデニンなどを添加した場合は, 緩慢活性化型触媒反応, すなわち, その変化率-反応時間曲線がS字型を描くことを認めたが, チアミンについては不活性化反応になることを確認している。⁽³⁾そこで, チアミン以外の水溶性ビタミンの数種について, 主に大過剰の酸素存在の下に, どのような反応プロファイルが得られるかを検討した。すなわち, リボフラビン, ピリドキシン, ピリドキサル, ピリドキサミン, ニコチン酸, ニコチンアミド, 葉酸, ビオチンについて, 空気中での静置法と酸素ガスを過剰に供給する酸素導入法により, 銅によるAsA接触酸化に対する抑制作用の有無を調べた。さらに, それらの中で抑制効果の認められたピリドキサミンと葉酸について, そのAsA値の対数と反応時間の反応プロファイルを検討し, ピリドキサミンの場合は—

次反応を示し、葉酸の場合は緩慢活性化型触媒反応を示し、指数関数によく近似した。また、ピリドキサミン濃度と AsA 接触酸化反応速度定数の関係を検討し、ピリドキサミンおよび葉酸の AsA 接触酸化抑制作用に対する pH の影響も調べた。

II 実験の部

1. 静置法

恒温槽中で所定 pH の Walpole の酢酸緩衝液 ($\mu=0.1$) 70ml を 35℃ にした後、ビタミン類水溶液と接触酸化剤としての過塩素酸銅水溶液各 10ml を加え、その 10 分後 AsA 水溶液 10ml を加え、全容 100ml とする。AsA 水溶液を加え終わった点を 0 分とし、反応中は空气中で静置した。以後、経時的に反応液 1 ml を取り、5 % メタリン酸水溶液 4 ml と混合し、8 mg % 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム水溶液で滴定し、AsA 残存量を求めた。

2. 酸素導入法

反応液を常に酸素で飽和させるため、700cc/min⁽⁴⁾ 以上で酸素ガスを通気しながら、25℃ の恒温槽中で静置法と同様に行った。葉酸については溶解する際に、0.1N 水酸化ナトリウム 5 ml を用いて溶かした後水で 50ml とし、その内 10ml を加えて所定濃度とした。また、pH 6.03 までの酸性の緩衝液は静置法と同じ酢酸緩衝液を、pH 7.13 と 8.08 は Michaelis のリン酸緩衝液 (M/15) を用いた。

III 実験結果および考察

1. 静置法による AsA 接触酸化抑制作用

pH 6.03 で、AsA 1×10^{-3} mol/l, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 1×10^{-5} mol/l, ビタミン類 1×10^{-4} mol/l で行った結果を Fig. 1 に示した。リボフラビン、ピリドキシン、ピリドキサル、ピリドキサミン、ニコチン酸、ニコチンアミドに抑制効果は認められなかった。富村⁽⁵⁾ はピリジン濃度の増加につれて、 O_2 uptake の反応速度が規則的に低下していると言っており、ピリジンが AsA 酸化抑制効果をもつ可能性が示唆される。また、江口⁽¹⁾ はニコチン酸は溶媒の水素イオン濃度により、AsA の自酸化を抑制したり促進したりすると述べている。そこで、筆者らはピリジン環をもつニコチン酸について、pH のみを富村の行った 4.31 に変えて調べたが、Fig. 2 に示すように、やはり抑制効果はなかった。次いで、リボフラビンは軽度な、また、葉酸は極めて良好な AsA 自酸化抑制を示したという江口⁽²⁾ の報告と比較検討するため、反応開始後 30 分の AsA 残存量を 100% とし、それ以降の $\log_{10} R$ ($R = (C_A / C_{A30}) \times 100$, C_A と C_{A30} はある時間と 30 分における AsA 残存濃度) を求め、Fig. 3 に示した。いずれも著しい AsA 接触酸化抑制効果は認められなかった。この条件では、ビタミン類の濃度が薄く、pH 6.03 の場合は AsA が 99% モノアニオンに解離し酸化が速くなっていることもあり、抑制効果がなかったと考えられる。

2. 酸素導入法による AsA 接触酸化抑制作用

pH 4.31, AsA 1×10^{-3} mol/l, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ 1×10^{-5} mol/l, ビタミン類 1×10^{-3} mol/l で行った結果を Fig. 4 に示した。ピリドキシン、葉酸には抑制効果はなく、ピリドキサミンにわずかに認められた。ニコチンアミド、ピリドキサル、ニコチン酸、ビオチンではわずかながら酸化を促進する傾向がみられた。ピリドキサミンが抑制効果を示したのは、その Cu^{2+} に対する安定度定数⁽⁶⁾ が $\log K_{MA}$ 10.20, $\log K_{MA2}$ 5.77 と比較的大きいためと推察される。pH を 5.89, ビタミン類濃度を 5×10^{-4} mol/l にした場合は、Fig. 5 のように葉酸に著しい抑制効果が認められた。

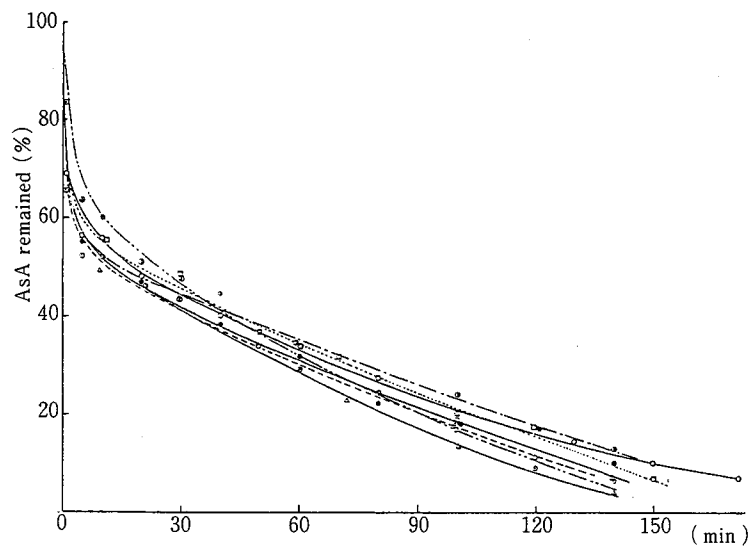


Fig. 1 Dependence of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Some Water-soluble Vitamins Left in the Air

Initial AsA, 1×10^{-3} mol/l; $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Each Vitamin, 1×10^{-4} mol/l; Temp. 35°C ; pH 6.03 Acetate buffer ($\mu = 0.1$); ○—○, Control; ●—●, Riboflavin; ●—●, Pyridoxine; ○—○, Pyridoxal; ○—○, Pyridoxamine; □—□, Nicotinic acid; △—△, Nicotinamide

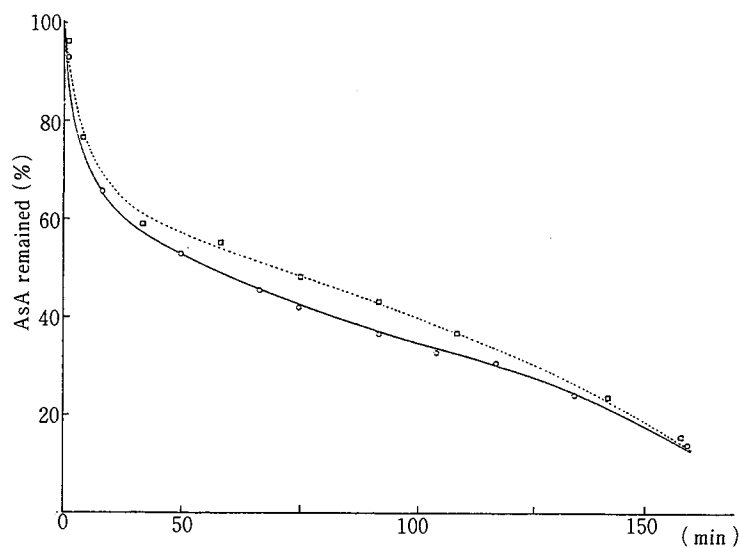


Fig. 2 Dependence of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Nicotinic Acid Left in the Air

Initial AsA, 1×10^{-3} mol/l; $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Nicotinic acid, 1×10^{-4} mol/l; Temp. 35°C ; pH 4.31 Acetate buffer ($\mu = 0.1$); ○—○, Control; □—□, Nicotinic acid

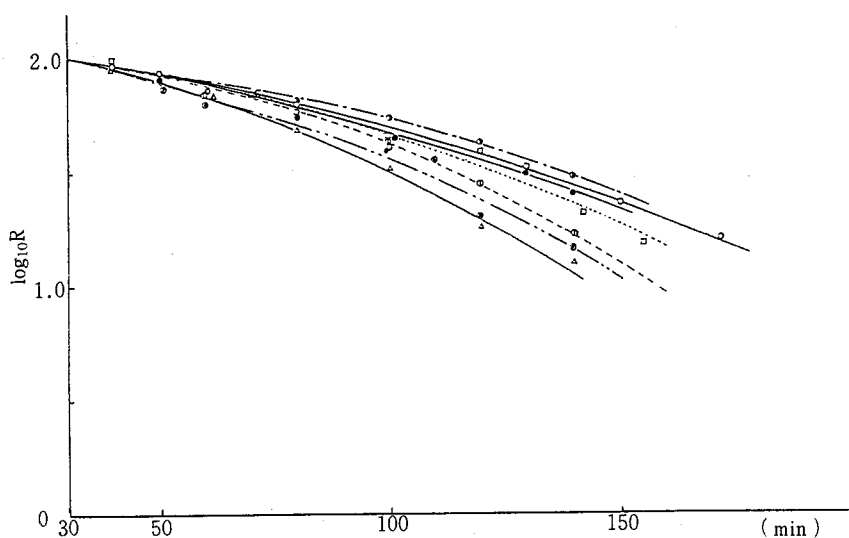


Fig. 3 Dependence of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Some Water-soluble Vitamins Left in the Air

The conditions are the same as Fig. 1.

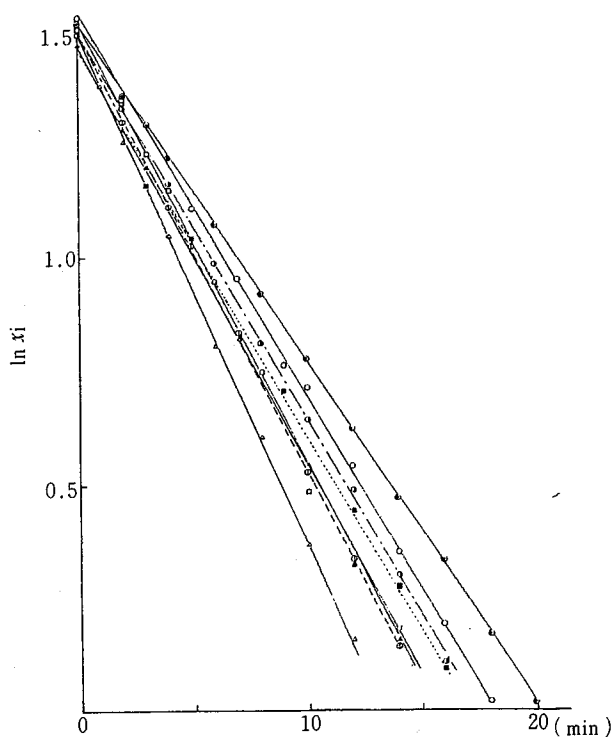


Fig. 4 Dependence of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Some Water-soluble Vitamins by Stirring under Oxygen Atmosphere.

Initial AsA, 1×10^{-3} mol/l; $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Each Vitamin, 1×10^{-3} mol/l; Temp. 25°C ; pH 4.31 Acetate buffer ($\mu=0.1$); \circ — \circ , Control; \bullet — \bullet , Pyridoxine; --- — --- , Pyridoxal; \odot — \odot , Pyridoxamine; \square — \square , Nicotinic acid; \triangle — \triangle , Nicotinamide; \blacksquare — \blacksquare , Folic acid; \blacktriangle — \blacktriangle , Biotin; ξ , the titration value of AsA with 2,6-Dichloro-indophenol solution.

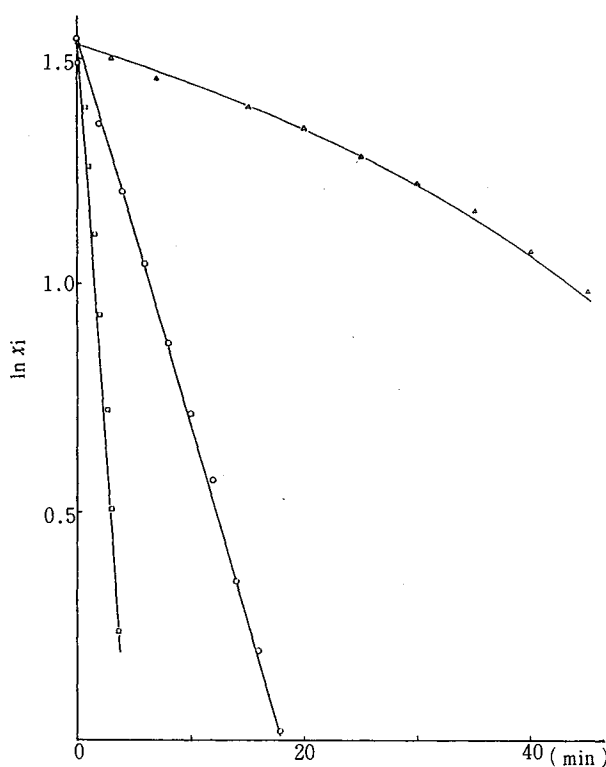


Fig. 5 Dependence of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Nicotinic Acid and Folic Acid by Stirring under Oxygen Atmosphere.

Initial AsA, 1×10^{-3} mol/l; $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Each Vitamin, 5×10^{-4} mol/l; Temp. 25°C ; pH 5.89 Acetate buffer ($\mu=0.1$); ○—○, Control; □—□, Nicotinic acid; △—△, Folic acid

3. ピリドキサミンの濃度による影響と反応速度定数との関係

ピリドキサミン濃度を変化させ、AsA 接触酸化抑制効果を調べ、Fig. 6 に示した。ピリドキサミン濃度 1×10^{-3} mol/l 以上では高濃度になるにつれ、コントロールより傾きが小さくなり、抑制効果が増大した。また、いずれの反応も AsA 残存率30%位までは一次反応を示し、直線 $\ln x_i = -kt + \ln x_0$ で表わされた。ただし、 t は反応時間、 $\ln x_0$ 、 $\ln x_i$ は0分およびある反応時間における滴定値の対数、 k は確実に一次反応であった反応20分までの $\ln x_i$ より最小二乗法で求めた傾き、すなわち、AsA 酸化の反応速度定数である。さらに、ピリドキサミン濃度と k の関係を示した Fig. 7 の曲線の形から見て、これは k 軸を切る双曲線 $k = \frac{a}{p+b}$ ，あるいは指数関数 $k = a e^{bp}$ (p はピリドキサミン濃度、 a と b は定数) に近似しているのではないかと考えられた。そこで、 k 、 p の値より、コンピューターを用いて最小二乗法で a および b を算出し、

$$\text{近似式 } k = \frac{2.2663 \times 10^{-4}}{p + 2.0469 \times 10^{-3}}, \text{ と } k = 0.08915 e^{-145.5269 p} \text{ を得た。}$$

これらの近似式につき、分散 $\frac{\sum (k_i - k_i')^2}{N-2}$ ，誤差% $\frac{k_i - k_i'}{k_i} \times 100$ (k_i は各ピリドキサミン濃度に

おける k の実測値、 k_i' は各近似式より得られた k) を求め、比較すると、指数関数の方が小さかった。したがって、指数関数がより近似の実験式といえる。つまり、この近似式の示すように、ピリドキサミン濃度が高くなるほど、AsA 接触酸化の反応速度定数 k は小さくなり、いいかえれば、

ピリドキサミン濃度が高いほど、銅とキレートをつくりやすくなって抑制効果が大きくなることを表わしている。

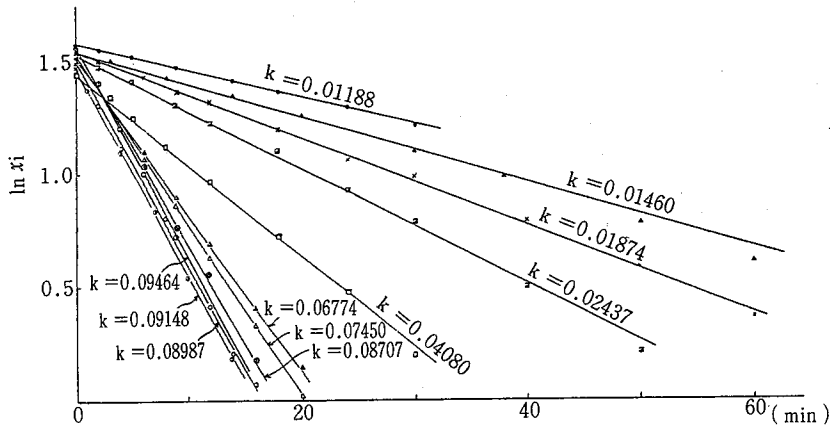


Fig. 6 Dependence of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Pyridoxamine Concentration by Stirring under Oxygen Atmosphere.

Initial AsA, 1×10^{-3} mol/l; $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Temp. 25°C ; pH 4.30 Acetate buffer ($\mu=0.1$); (○), Control; Pyridoxamine Concentration: (●), 1.0×10^{-5} mol/l; (◐), 1.0×10^{-4} mol/l; (⊙), 0.5×10^{-3} mol/l; (△), 1.0×10^{-3} mol/l; (▲), 2.5×10^{-3} mol/l; (◻), 5.0×10^{-3} mol/l; (◼), 7.5×10^{-3} mol/l; (×), 1.0×10^{-2} mol/l; (▲), 1.25×10^{-2} mol/l; (●), 1.5×10^{-2} mol/l

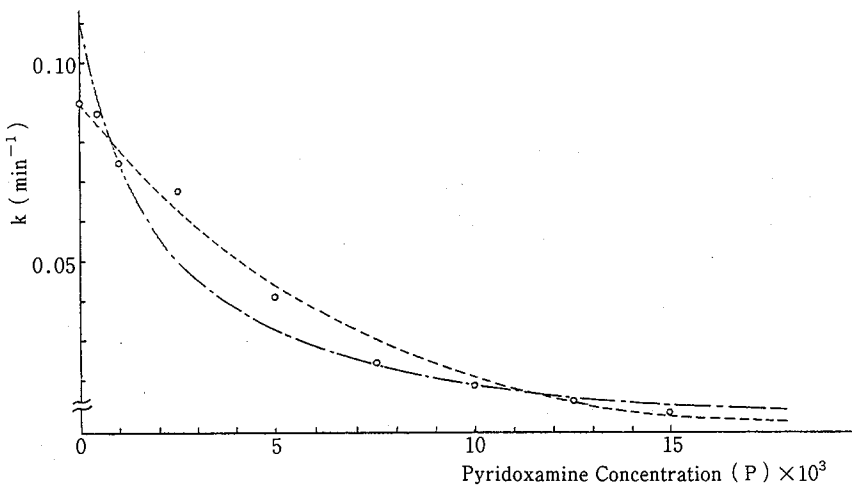


Fig. 7 Dependence of the Rate Constant k of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Pyridoxamine by Stirring under Oxygen Atmosphere.

Initial AsA, 1×10^{-3} mol/l; $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Temp. 25°C ; pH 4.30 Acetate buffer ($\mu=0.1$);
 ---, $k_1 = \frac{2.2663 \times 10^{-4}}{P + 2.0469 \times 10^{-3}}$; ·····, $k_2 = 0.08915 e^{-145.5269P}$; (○), the slope k in Fig. 6.

4. ビタミン B₆ の AsA 接触酸化抑制作用に及ぼす pH の影響

ビタミン B₆ の AsA 接触酸化抑制作用を、pH を変化させて調べ、それぞれについてⅢの3で記

したように k を求め、Fig. 8 に示した。なお、 k/k_0 はコントロールの反応速度定数 k_0 の影響を考慮に入れるため求めた。コントロールの反応速度定数の変化 (図中 k_0) は pH 4 ~ 8 の間では pH 7 付近が最も高くなった。これは pH の上昇につれ AsA のモノアニオンへの解離が進み、pH 7 付近ではほとんどモノアニオンとなって反応速度が大きくなるものと考えられる。また、AsA-ピリドキサミン-銅の反応系の反応速度定数 (k_{PAM}) は pH が変化してもさほど変動は見られなかった。 (k_{PAM}/k_0) をみると、ピリドキサミンは pH が上昇するにつれ、値が小さくなり、pH 7.13 で最も低かった。すなわち、ピリドキサミンの抑制効果は、この pH 範囲では pH が高くなるにしたがって増大し、pH 7.13 で最高を示したと言える。これらのことから、ピリドキサミンの抑制効果は、AsA モノアニオンの解離度に影響されず、pH が高くなると、ピリドキサミンの pK_1 10.13, pK_2 8.01, pK_3 3.37⁽⁶⁾ から考えるとおそらく 3 位のフェノール部、4 位のアミン部などのプロトンの解離が進み、銅イオンとのキレートが生成しやすくなり抑制効果が大きくなるのではないかとと思われる。ピリドキシン (k_{PIN})、ピリドキサル (k_{PAL}) では、pH を変化させてもコントロールの変化 (k_0) とほとんど同じ動向を示し、抑制効果はみられなかった。ピリドキサルについては、 Cu^{2+} に対する安定度定数⁽⁷⁾が $\log K_{MA} 3.51$, $\log K_{MA_2} 3.49$ と低いので、銅イオンとのキレート生成量が小さいためと考えられる。

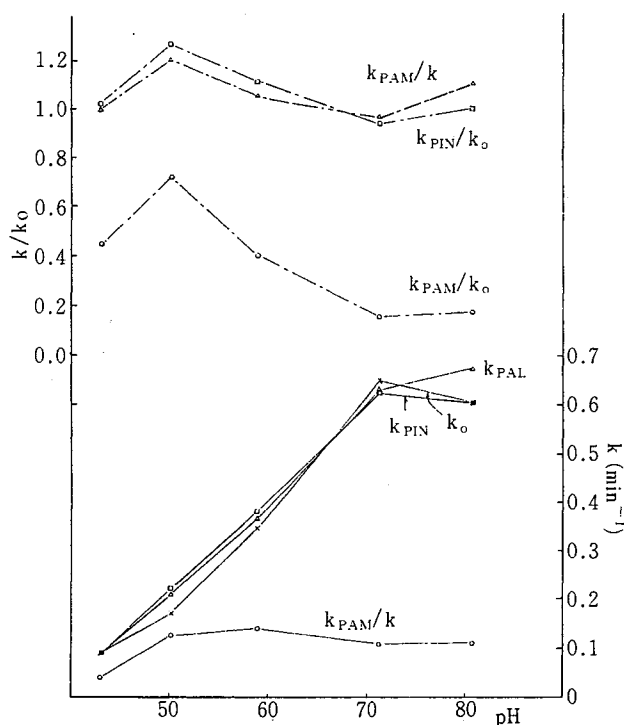


Fig. 8 Dependence of the Rate Constant on pH for the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid in the Presence of Vitamin B₆ by Stirring under Oxygen Atmosphere

Initial AsA, 1×10^{-3} mol/l; $Cu(ClO_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Each Vitamin, 5×10^{-3} mol/l; Temp. 25°C; The used pH value of: Acetate buffer, 4.30, 5.02, 5.89; Phosphate buffer, 7.13, 8.08; $\times \longrightarrow \times$, k_0 ; $\bigcirc \longrightarrow \bigcirc$, k_{PAM} ; $\bigcirc \longrightarrow \bigcirc$, k_0 ; $\square \longrightarrow \square$, k_{PIN}/k_0 ; $\square \longrightarrow \square$, k_{PIN}/k_0 ; $\triangle \longrightarrow \triangle$, k_{PAL} ; $\triangle \longrightarrow \triangle$, k_{PAL}/k_0

5. 葉酸濃度による影響と反応速度定数との関係

AsA 濃度 $0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 5.0 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ のそれぞれに対し、葉酸濃度を $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ と変化させて、AsA 接触酸化抑制効果を調べた。そのうち AsA 濃度 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ の結果を Fig. 9, 10 に示した。いずれの AsA 濃度においても、葉酸濃度が高くなるにつれ、抑制効果は増大する傾向であった。 $\ln C_A$ を反応時間に対してプロットした Fig. 9 のように、上に凸の曲線関係が得られ、さらに Fig. 10 に示すように変化率—反応時間曲線は S 字型を示したことから、この反応は緩慢活性化型触媒反応といえる。また、葉酸濃度が高くなるほど、Fig. 9 のように反応前期の $\ln C_A$ の勾配はゆるやかとなり、Fig. 10 のように変化率—反応時間曲線の勾配もゆるやかとなった。このことは、AsA 接触酸化抑制物質としてアデニン、グアニンを用いた結果⁽³⁾と同様であった。次に銅触媒の活性化が一次反応であると仮定すると、 $\ln C_A$ と反応時間 t との関係は指数関数 $\ln C_A = a e^{bt} - c$ (a, b, c は定数) に従うのではないかと考え、実測値 $\ln(C_A \times 10^5)$ と t よりコンピューターで最小二乗法を用いて各々の近似式を得た。この近似式より導いた値は実測値とよく一致し、誤差は 1 % 以下であった。各濃度における近似式を Table 1 に示した。

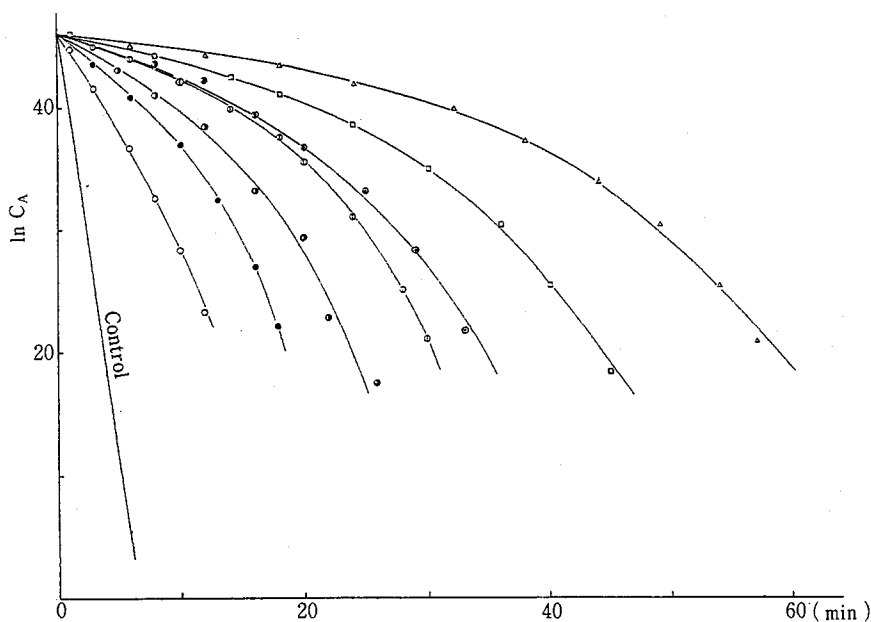


Fig. 9 Dependence of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Folic Acid Concentration by Stirring under Oxygen Atmosphere

Initial AsA. $1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$; $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, $1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$; Temp. 25°C ; pH 5.89 Acetate buffer ($\mu=0.1$); Folic acid Concentration: (○), $0.5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$; (●), $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$; (◊), $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$; (◐), $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$; (◑), $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$; (◒), $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$; (△), $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$; C_A , the remaining concentration of AsA.

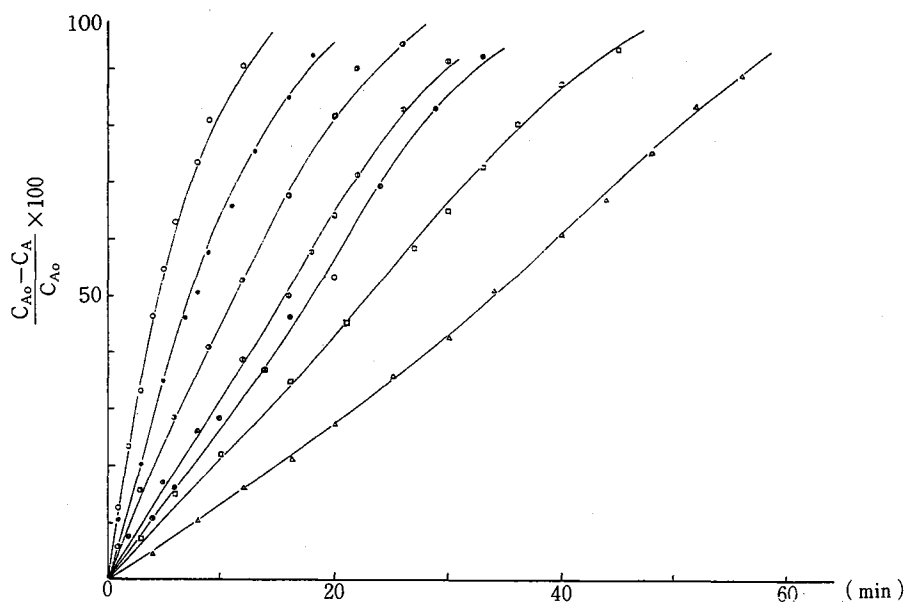


Fig.10 Dependence of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Folic Acid Concentration by Stirring under Oxygen Atmosphere

Initial AsA, 1×10^{-3} mol/l; $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Temp. 25°C ; pH 5.89 Acetate buffer ($\mu=0.1$); The marks of Folic acid concentration are the same as in Fig. 9.

Table 1 Approximate Equation expressed the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid in the Presence of Folic Acid.

Conc. (mol/l)		$\ln C_A = a e^{b t} - c$			Conc. (mol/l)		$\ln C_A = a e^{b t} - c$		
Folic acid	AsA $\times 10^{-3}$	a	b	c	Folic acid	AsA $\times 10^{-3}$	a	b	c
0.5×10^{-4}	0.1	-0.5980	0.2493	-2.7289	1.5×10^{-4}	0.1	-2.0605	0.0770	-4.3579
	0.25	-2.5773	0.0798	-5.7813		0.25	-1.2117	0.0795	-4.4055
	0.5	-2.2600	0.0740	-6.1812		0.5	-0.7678	0.0819	-4.6608
	1.0	-2.8274	0.0533	-7.4479		1.0	-0.5418	0.0725	-5.1084
	1.5	-2.3867	0.0491	-7.4086		1.5	-0.4174	0.0699	-5.3992
	2.0	-2.0782	0.0494	-7.3852		2.0	-0.3857	0.0635	-5.6457
	4.0	-1.0621	0.0569	-7.0584		4.0	-0.1921	0.0612	-6.1825
1.0×10^{-4}	5.0	-1.3741	0.0420	-7.6227		5.0	-0.5008	0.0265	-6.7058
	0.1	-1.0424	0.1570	-3.2917	2.0×10^{-4}	0.1	-7.3368	0.0217	-9.6545
	0.25	-2.4008	0.0604	-5.6323		0.25	-1.1830	0.0683	-4.3715
	0.5	-1.2145	0.0829	-5.1086		0.5	-0.5935	0.0786	-4.4802
	1.0	-0.8073	0.0798	-5.3885		1.0	-0.3581	0.0690	-4.9293
	1.5	-0.7005	0.0721	-5.6926		1.5	-0.2849	0.0651	-5.2535
	2.0	-0.5750	0.0711	-5.8340		2.0	-0.2111	0.0633	-5.4820
	4.0	-0.3178	0.0695	-6.3002		4.0	-0.1920	0.0450	-6.1602
	5.0	-0.2518	0.0689	-6.4348		5.0	-0.1459	0.0466	-6.3614

Conc. (mol/l)		$\ln C_A = a e^{bt} - C$			Conc. (mol/l)		$\ln C_A = a e^{bt} - C$		
Folic acid	AsA $\times 10^{-3}$	a	b	c	Folic acid	AsA $\times 10^{-3}$	a	b	c
2.5×10^{-4}	0.1	-3.3730	0.0387	-5.7237	4.0×10^{-4}	0.1	-1.8566	0.0420	-4.2187
	0.25	-1.0952	0.0603	-4.2921		0.25	-0.4945	0.0596	-3.7244
	0.5	-0.6246	0.0643	-4.5119		0.5	-0.3495	0.0517	-4.2235
	1.0	-0.3163	0.0653	-4.8734		1.0	-0.1769	0.0459	-4.7481
	1.5	-0.2106	0.0600	-5.1959		1.5	-0.1236	0.0416	-5.0805
	2.0	-0.1622	0.0552	-5.4359		2.0	-0.1006	0.0357	-5.3547
	4.0	-0.1637	0.0423	-6.1483		4.0	-0.0820	0.0284	-6.0281
	5.0	-0.1259	0.0429	-6.3260		5.0	-0.0750	0.0267	-6.2570
3.0×10^{-4}	0.1	-2.4654	0.0441	-4.7459					
	0.25	-0.7204	0.0691	-3.8831					
	0.5	-0.4541	0.0631	-4.3470					
	1.0	-0.2768	0.0528	-4.8403					
	1.5	-0.2011	0.0497	-5.1567					
	2.0	-0.1495	0.0466	-5.3793					
	4.0	-0.1321	0.0336	-6.1114					
	5.0	-0.4217	0.0126	-6.6418					

また、近似式 $\ln C_A = a e^{bt} - c$ を微分すると、

$$(\ln C_A)' = a b e^{bt} \dots (1)$$

となり、 $t = 0$ を代入すると

$$(\ln C_{A0})' = a b$$

となる。 $a b$ は 0 分における曲線の傾きを表わす。さらに(1)式より次の速度式が得られる。

$$-\frac{1}{C_A} \cdot \frac{dC_A}{dt} = a b e^{bt}, \quad -\frac{dC_A}{dt} = C_A \cdot a b e^{bt}$$

そして、 $t = 0$ のとき $C_A = C_{A0}$ だから、

$$-\frac{dC_A}{dt} = C_{A0} \cdot a b$$

となり、 $C_{A0} \cdot a b$ は初速度を表わす。この $a b$ また $C_{A0} \cdot a b$ と葉酸濃度の関係を検討し、Fig. 11, 12に示した。Fig. 11より、 $a b$ と葉酸濃度の関係は双曲線もしくは指数関数で表わされるのではないかとされた。初速度については Fig. 12より、AsA 濃度が高いほど初速度は高くなるが、葉酸濃度が増すにつれて、その差はなくなり、ほぼ一定となった。この一定を示すような高い葉酸濃度においては、銅イオンに対してキレートが飽和状態になっているとも考えられる。これらの関数関係についてはなお検討中である。

6. 葉酸の AsA 接触酸化抑制作用に及ぼす pH の影響

Fig. 13で示すように、pH 5.89で最も高い抑制効果が認められた。江口⁽²⁾は葉酸の有する強力な AsA 自酸化抑制作用はプテリジン核部にあるとせねばならないと述べている。そこで、筆者らはプテリジン核4位のフェノール性 OH 基が抑制作用に関与しているのではないかと着目したが、フェノールの pK_a ⁽⁶⁾ 9.98に近く、また、葉酸の pK_a が8.26にもかかわらず、アルカリ側では抑制効果は酸性側に比べ低かった。したがって、pH 5.89で最も高い抑制効果を示したということは、抑制効果は4位のフェノールのみによるキレートではなく、5位の OH 基と N^7 、あるいは N^7 と10位の NH 基との間の一量体または二量体のキレートなどによるものと考えられる。

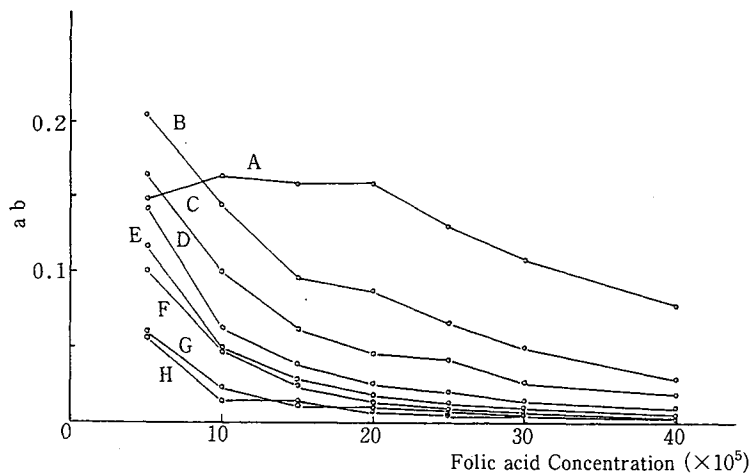


Fig.11 Profile of Slope, $a b$ of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Folic Acid Concentration by Stirring under Oxygen Atmosphere

$\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Temp. 25°C ; pH 5.86 Acetate buffer ($\mu=0.1$); AsA Concentration: A, 0.1×10^{-3} mol/l; B, 0.25×10^{-3} mol/l; C, 0.5×10^{-3} mol/l; D, 1.0×10^{-3} mol/l; E, 1.5×10^{-3} mol/l; F, 2.0×10^{-3} mol/l; G, 4.0×10^{-3} mol/l; H, 5.0×10^{-3} mol/l; $a b$, the slope calculated from table 1.

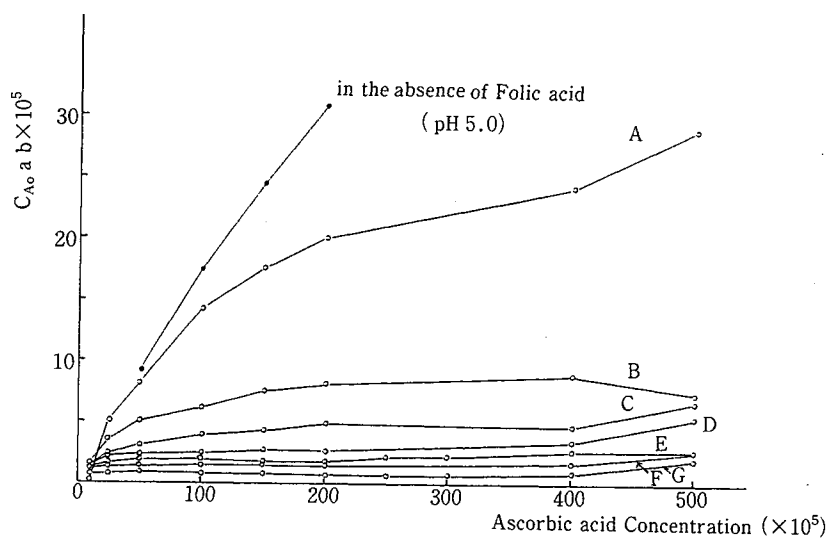


Fig.12 Profile of Initial Rate $C_{A_0} a b$ of the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid on Ascorbic Acid Concentration by Stirring under Oxygen Atmosphere

$\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Temp. 25°C ; pH 5.89 Acetate buffer ($\mu=0.1$); Folic acid Concentration: A, 0.5×10^{-4} mol/l; B, 1.0×10^{-4} mol/l; C, 1.5×10^{-4} mol/l; D, 2.0×10^{-4} mol/l; E, 2.5×10^{-4} mol/l; F, 3.0×10^{-4} mol/l; G, 4.0×10^{-4} mol/l; $C_{A_0} a b$, the initial rate calculated from table 1.

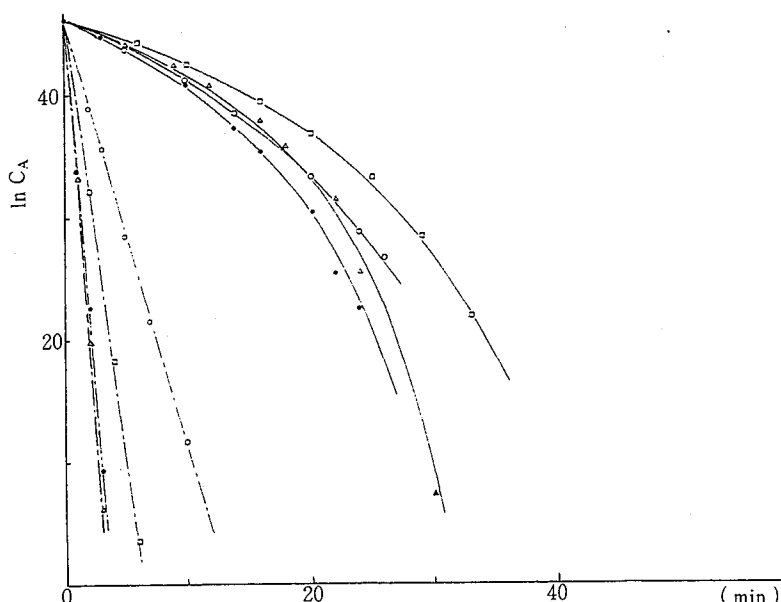


Fig.13 pH Effect for the Catalytic Oxidation of Ascorbic Acid in the Presence of Folic Acid by Stirring under Oxygen Atmosphere

Initial AsA, 1×10^{-3} mol/l; $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, 1×10^{-5} mol/l; Folic acid, 2.5×10^{-4} mol/l; Temp. 25°C ; The used pH value of: Acetate buffer, 5.02, 5.89; Phosphate buffer, 7.13, 8.08; ---, Control; (○), pH 5.02; (□), pH 5.89; (△), pH 7.13; (●), pH 8.08

IV 要 約

1. 静置法, 35°C , pH 6.03, ビタミン類濃度 1.0×10^{-4} mol/l では, リボフラビン, ピリドキシン, ピリドキサル, ピリドキサミン, ニコチン酸, ニコチンアミドに AsA 接触酸化抑制効果はなかった。また, pH のみ 4.31 に変えた場合のニコチン酸にも抑制効果は認められなかった。

2. 酸素導入法, 25°C , pH 4.31, ビタミン類濃度 1×10^{-3} mol/l において, ピリドキサミンにわずかに抑制効果が認められ, ピリドキシン, 葉酸には認められず, ニコチンアミド, ピリドキサル, ニコチン酸, ビチオンにはわずかながら酸化を促進する傾向があった。pH 5.89, ビタミン類濃度 5×10^{-4} mol/l では葉酸に著しい抑制効果が認められた。

3. ピリドキサミンは, その濃度が 1×10^{-3} mol/l 以上では明らかに抑制効果が認められ, その反応は一次反応であるといえ, 高濃度になるほど, 抑制効果は増大した。ピリドキサミン濃度 P と

AsA 酸化反応速度定数 k の関係は, 双曲線 $k = \frac{2.2663 \times 10^{-4}}{P + 2.0469 \times 10^{-3}}$ より, 指数関数 $k = 0.08915 e^{-145.5269 P}$ によく近似しているようであった。

4. ピリドキサミンの抑制効果は, コントロールの AsA 酸化反応速度定数変化との比較により, pH 4 から 8 の間では pH の上昇につれて増大し, pH 7.13 で最高を示したといえる。これより, ピリドキサミンの抑制効果は, AsA モノアニオンの解離度に影響されず, pH が高くなると, 3 位のフェノール部や 4 位のアミン部などの解離部分が多くなるため, 銅イオンとキレートを生成しやすくなり抑制効果が大きくなると考えられる。

6. 葉酸の抑制効果を調べた結果, AsA 残存濃度の対数 $\ln C_A$ と反応時間 t との関係は, 上に凸の

緩慢活性化型触媒反応を示し、その変化率-反応時間曲線はS字型を示した。また、葉酸濃度が高くなるに従い、反応前期の $\ln C_A$ の勾配、変化率-反応時間曲線の勾配はゆるやかとなり、抑制効果は増大した。各条件における $\ln C_A$ と t の関係は、指数関数 $\ln C_A = a e^{bt} - c$ の近似式に誤差1%以下で合致した。

7. 葉酸の抑制効果に対する pH の影響を、pH 5 から 8 の範囲で変化させて調べた結果、pH 5.89 で最大の抑制効果が得られた。葉酸の抑制効果は、筆者らが着目した4位のフェノールのみによるキレートではなかった。

終わりに臨み、本研究にご協力頂きました岡崎弥生、山内朱美様に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 江口茂：慈医誌 72, 2241~2243(1957).
- 2) 江口茂：ibid. 2227~2240.
- 3) 未発表.
- 4) M. M. Taqui Khan and A. E. Martell : J. A. C. S., 89, 1476(1967).
- 5) 富村太郎：生化学, 24, 29(1952); 24, 33(1952).
- 6) LARS GUNNAR SILLEN : *Stability Constants of Metal-ion Complexes, section II ; Organic Ligands* (London the Chemical Society, Burlington House, 1964), p. 585, 676, 472, 359, 722, 1091
- 7) LARS GUNNAR SILLEN : *Stability Constants of Metal-ion Complexes, Supplement I*, (London the Chemical Society, Burlington House), p. 553.